





DEVICE FOR AUTOMATICALLY DISPENSING MICROSCOPIC AMOUNTS OF LIQUID

Patent number: DE10117064
Publication date: 2003-02-06
Inventor: KUHN HENRIK (DE); MAYER MICHAEL (DE)
Applicant: MORPHOCHEM AG (DE)
Classification:
- **international:** B01J4/02; G01N1/14; G01F13/00
- **european:** B01J19/00C, B01L3/02D
Application number: DE20011017064 20010405
Priority number(s): DE20011017064 20010405

Also published as:

 WO02081088 (A3)
 WO02081088 (A2)
 EP1372849 (A3)
 EP1372849 (A2)

Abstract not available for DE10117064

Abstract of correspondent: **WO02081088**

The invention relates to a device for automatically dispensing microscopic amounts of liquids, comprising at least one moveable dispensing head with a plurality of cartridges fixed thereto, a moveable object carrier with at least one object disposed thereon for receiving the dispensed amount of liquid, in addition to a control device which is used to control the dispensing process. The cartridges are respectively provided with a tank filled with liquid, a micro-dosing element in fluidic connection with said tank, and a fixing element which is secured to the dispensing head.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

01
12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 101 17 064 A 1**

51 Int. Cl. 7:
B 01 J 4/02
G 01 N 1/14
G 01 F 13/00

21 Aktenzeichen: 101 17.064.5
22 Anmeldetag: 5. 4. 2001
43 Offenlegungstag: 6. 2. 2003

K 46.132

DE 101 17 064 A 1

71 Anmelder:
Morphochem AG, 81379 München, DE

74 Vertreter:
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer & Kollegen, 81541
München

72 Erfinder:
Kuhn, Henrik, 82152 Krailling, DE; Mayer, Michael,
81241 München, DE

56 Entgegenhaltungen:
DE 198 54 919 A1
DE 197 54 000 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Vorrichtung zum automatischen Dispensieren mikroskopischer Volumina von Fluiden

57 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Dispensieren mikroskopischer Volumina von Fluiden, welche wenigstens einen bewegbaren Dispensierkopf mit einer Mehrzahl daran befestigter Patronen, einen bewegbaren Objektträger mit wenigstens einem darauf befindlichen Objekt zur Aufnahme der dispensierten Fluidvolumina, sowie eine Steuereinrichtung zur Steuerung des Dispensiervorganges umfasst, wobei die Patronen jeweils einen mit Fluid gefüllten Tank, ein mit dem Tank fluidmäßig verbundenes Mikrodosierelement sowie ein Befestigungselement zur Befestigung am Dispensierkopf aufweisen.

DE 101 17 064 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Dispensieren mikroskopischer Volumina von Fluiden, sowie deren Verwendungen.

[0002] In Labor, Produktion, Forschung und Entwicklung werden immer schnellere und präzisere Vorrichtungen zur Fluiddosierung in mikroskopischen Volumenbereichen (1–1000 nL) benötigt, um mit möglichst geringem Aufwand an Chemikalien aus möglichst vielen Daten Ergebnisse zu gewinnen. Vor allem im Bereich der Kombinatorischen Chemie sollen viele Reaktionen in kleinsten Volumina parallel ablaufen, wobei die entsprechenden Reaktionslösungen in mikroskopischen Mengen in die Reaktionsgefäße, beispielsweise Mikrotiterplatten, eingebracht werden müssen.

[0003] Vorrichtungen zum automatischen Dispensieren mikroskopischer Volumina von Fluiden sind bekannt. Prinzipiell können derartige Vorrichtungen in Dispensierverfahren mit Kontakt zur Oberfläche und kontaktlose Dispensierverfahren unterteilt werden.

[0004] Bei den Dispensierverfahren mit Kontakt zur Oberfläche berühren Nadeln, Hohlkanülen, Kunststoffspitzen und dergleichen die Oberfläche des Zielobjektes, wobei erst bei der Berührung das Fluid abgegeben wird. Dabei spielen die Oberflächenspannung und Viskosität des zu dosierenden Fluids, Adhäsion des Fluids an der Oberfläche sowie Schwerkrafteffekte eine wichtige Rolle.

[0005] Im Unterschied hierzu erfolgt bei den kontaktlosen Dispensierverfahren keine Berührung der genannten Teile mit der Oberfläche des Zielobjektes. Da die Adhäsion des Fluids an der Oberfläche bei diesen Verfahren fehlt, muß die Oberflächenspannung des Fluids allein durch die kinetische Energie des Fluids bei dessen Austreten aus der Austrittsöffnung überwunden werden. Sollen Volumina unterhalb von ca. 2 µL dispensiert werden, kann dies nur mit einer sehr hohen kinetischen Energie des Fluids erfolgen, die häufig piezoelektrisch erzeugt wird. Hierzu kommt oft ein zylindrischer Stapel aus Piezokeramiken mit einer darin befindlichen Glaskapillare zum Einsatz, der mit einem Spannungspuls elektrisch angesteuert wird. Das in der Piezokeramik aufgebaute elektrische Feld führt zur Kontraktion des Piezostapels und damit zu einem Druckpuls auf die Glaskapillare, welcher das Fluid ausstößt. Die so abgegebenen Tropfen haben je nach Kammervolumen der Glaskapillare ein Volumen im pL-Bereich; größere Mengen können additiv erzeugt werden. Die zu dispensierenden Fluidmengen werden durch das Dosierelement, welches fluidisch mit einer Spritze und einem Schlauch verbunden ist, aus einem Fluidvorrat aufgezogen, wobei der Schlauch auch zur Speicherung der Fluide dient.

[0006] Vorteilhaft bei den kontaktlosen Dispensierverfahren ist vor allem, dass durch den fehlenden Kontakt mit der Oberfläche auch auf empfindliche Materialien dispensiert werden kann. Des weiteren läßt sich ein Übertrag, d. h. eine Kreuzkontamination zwischen den zu dispensierenden Flüssigkeiten vermeiden.

[0007] Es gibt zurzeit eine Reihe von Firmen, die kontaktlose automatische Dispensiervorrichtungen anbieten. Beispielsweise vertreibt die Firma TECAN AG mit dem Firmensitz in Hombrechtikon, Schweiz seit jüngster Zeit ein automatisches Dispensiersystem unter dem Handelsnamen GENESIS NPS, welches auf einem kontaktlosen Dispensierverfahren basiert. Dieses Dispensiersystem ist mit 1 bis 8 Pipettiervorrichtungen ausgerüstet, bei denen über eine Piezokeramik die Volumina ausgestoßen werden. Mit speziellen Nanopipettiervorrichtungen sind Volumina im Bereich von 10–700 nL, jedoch nur ca. 0,1–2 nL pro Schuss, dispensierbar; werden gewöhnliche Hohladeln aufgesetzt,

können bis zu 5 mL dispensiert werden. Jede der bis zu 8 Pipettiervorrichtungen kann durch einen eigenen Kanal angesteuert werden. Die Dispensiergenauigkeit ist kleiner als 5% für einen einzelnen Kanal und kleiner als 10% für mehrere Kanäle. Das zu dispensierende Fluid kann aus Vorratsgefäßen, sowie 96-Well-Mikrotiterplatten und 384-Well-Mikrotiterplatten aspiriert werden; das aspirierte Fluid kann in 96-Well-Mikrotiterplatten und 384-Well-Mikrotiterplatten dispensiert werden. Der Dispensierkopf wird relativ zu dem die Mikrotiterplatten aufnehmenden Träger bewegt, wobei die einzelnen Spritzen zusätzlich in der zu der Ebene der Mikrotiterplatten senkrechten Richtung abgesenkt werden können. [0008] Das beispielhaft dargestellte Pipettiersystem der Firma TECAN AG, wie auch alle anderen im Stand der Technik bekannten Dispensiersysteme weiterer Firmen, lassen zahlreiche Wünsche für die praktische Anwendung offen.

[0009] Nachteilig bei diesen Systemen ist insbesondere, dass das Fluid für jeden Dispensiervorgang in die wenigen vorhandenen Spritzen (i. a. maximal 8) und Schläuche mit Dosierelementen aspiriert werden muß, so dass bei jedem Fluidwechsel die Spritzen samt zugehöriger Schläuche und Dosierelemente sauber gespült werden müssen, um eine Kreuzkontamination der aufeinanderfolgend aspirierten Fluide zu vermeiden. Das Spülen benötigt jedoch viel Zeit, da die Spülflüssigkeit nur mit begrenztem Druck und Fluß durch diese Elemente gepumpt werden kann. Zudem muß nach dem Spülen das nächste Fluid erst wieder aspiriert werden, bis es dispensiert werden kann, so dass nicht nur durch das Spülen, sondern auch durch das Aspirieren Zeit verloren geht. Ein schneller, wahlfreier Zugriff auf verschiedene Fluide wird dadurch behindert.

[0010] Ferner ist jeder neue Dispensiervorgang stets mit einem Totvolumen an nicht-dispensiertem Fluid verbunden, welches beim Spülen der Spritzen, Schläuche und Dosierelemente verworfen wird. Bei teuren Fluiden können diese Verluste beträchtliche Kosten verursachen und Versuchsreihen mit relativ kleinen ausgestoßenen Fluidmengen wegen der dabei auftretenden relativ hohen Fluidverluste sogar unmöglich machen. Jedenfalls sind die herkömmlichen Dispensiersysteme in ökonomischer Hinsicht nicht optimal.

[0011] Bei den herkömmlichen automatischen Dispensiersystemen ist nachteilig, dass meist nur Tropfen mit sehr geringen Volumina im pL-Bereich kontaktlos dispensiert werden können. Um größere Mengen an Fluid, insbesondere im nL- und sub-µL-Bereich zu dispensieren, müssen diese Dispensiersysteme deshalb sehr schnell und mit hoher Wiederholfrequenz (bis zu ca. 10 kHz) dispensieren. Überdies verstopfen diese Dispensiervorrichtungen leicht, und es müssen für jedes Fluid vor dem Dispensieren erst Kalibrierdaten erstellt werden, so dass ein fluidunabhängiges Dispensieren nicht möglich ist.

[0012] Ein weiterer Nachteil bei den meisten im Stand der Technik bekannten Systemen ergibt sich daraus, dass nur auf Objekte eines definierten Formates dispensiert werden kann. Beispielsweise kann mit dem automatischen Dispensiersystem der Fa. TECAN AG nur auf 96-Well-Mikrotiterplatten oder 384-Well-Mikrotiterplatten dispensiert werden. Ein Dispensiervorgang auf 1536-Well-Mikrotiterplatten erscheint bei diesem System aufgrund der dabei auftretenden mechanischen Probleme bereits fraglich. Es ist nicht möglich auf beliebige Stellen eines Objektes zu dispensieren.

[0013] Es ist deshalb wünschenswert über ein automatisches Dispensiersystem zu verfügen, das die oben genannten Nachteile der im Stand der Technik bekannten automatischen Dispensiersysteme überwindet. Ein solches automatisches Dispensiersystem sollte insbesondere wesentlich mehr als maximal 8 voneinander unabhängige Dispensier-

einheiten zum Dispensieren von Fluiden aufweisen, so dass ein Ensemble üblicherweise verwendeter Fluide ständig verfügbar ist. Jede dieser Dispensiereinheiten sollte unabhängig von den anderen Dispensiereinheiten ansteuerbar sein und fluidunabhängig volumengenau dispensieren können. Vor allem sollte jede Dispensiereinheit in der Lage sein, auf jeden Ort des Objektes zu dispensieren, so dass ein Dispensieren auf jedes formatfreie Objekt möglich wird. Ferner sollte bei der Gestaltung der Dispensiereinheiten auf Spritzen und Schläuche verzichtet werden, so dass bei einem Fluidwechsel jedes neuerliche zeitaufwändige Spülen und Aspirieren von Fluid verzichtbar wird. Verbunden mit einer großen Zahl voneinander unabhängiger Dispensiereinheiten kann so ein schneller, wahlfreier Zugriff auf die gewünschten Fluide erfolgen. Jede Dispensiereinheit sollte ein minimales Volumen von 1 nL dispensieren können, jedoch sollten vor allem größere Volumina im Bereich von 10–1000 nL, insbesondere 50–500 nL mit einem Schuss dispensierbar sein. Vor allem bei kleinen Mengen dispensierten Fluids sollten i. w. keine Totvolumina an nicht-dispensiertem Fluid auftreten. Weiterhin sollten die Dispensiereinheiten billiger als die herkömmlichen Systeme aus Spritzen, Schläuchen und Dosierelementen sein und leicht und schnell auswechselbar am Dispensierkopf befestigt werden können. Schließlich sollten Objekt und Dispensierkopf relativ zueinander schnell bewegt werden können.

[0014] Diese Aufgaben werden durch eine Vorrichtung zum automatischen Dispensieren mikroskopischer Volumina von Fluiden gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung erfüllt. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind durch die Merkmale der abhängigen Ansprüche angegeben.

[0015] Erfindungsgemäß wird eine Vorrichtung zum automatischen Dispensieren mikroskopischer Volumina von Fluiden angegeben, wobei die Vorrichtung wenigstens einen bewegbaren oder nichtbewegbaren Dispensierkopf mit einer Mehrzahl daran befestigter Patronen, einen bewegbaren Objektträger mit wenigstens einem darauf befindlichen Objekt zur Aufnahme der dispensierten Fluidvolumina, sowie eine Steuereinrichtung zur Steuerung des Dispensiervorganges umfasst, und die Patronen jeweils einen mit Fluid gefüllten Tank, ein mit dem Tank fluidmäßig verbundenes Mikrodosierelement, sowie ein Befestigungselement zur Befestigung am Dispensierkopf aufweisen.

[0016] Die erfindungsgemäße Dispensiervorrichtung verwendet anstelle der bei den herkömmlichen Dispensiervorrichtungen eingesetzten Spritzen, Schläuche und Dosierelemente eine Mehrzahl von fluidbefüllten Patronen, die jeweils mit einem Mikrodosierelement fluidmäßig verbunden sind. Dabei umfasst jede Patrone einen Tank, ein Mikrodosierelement, sowie ein Befestigungselement zur Befestigung am Dispensierkopf. Sind die Mikrodosierelemente in den Patronen integriert, wirken die Patronen als eine schützende Abschirmung für die zumeist mechanisch empfindlichen Mikrodosiervorrichtungen, wodurch praktisch handhabbare Dispensiereinheiten entstehen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann einen oder mehrere Dispensierköpfe aufweisen, an denen jeweils Patronen befestigbar sind.

[0017] Jeder Dispensierkopf ist bewegbar oder nichtbewegbar; der Objektträger ist jedenfalls bewegbar. Auf dem Objektträger befindet sich wenigstens ein Objekt, auf welches die Fluide dispensiert werden sollen. Eine Steuereinrichtung steuert jeden Dispensiervorgang so, dass eine oder mehrere beliebige Patronen die in ihrem Tank befindlichen Fluide auf wenigstens ein Objekt dispensieren. Als Fluide kommen beispielsweise Lösungen von Substanzen in Lösungsmitteln wie z. B. Wasser, Methanol, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dichlormethan, Benzol

und Tetrahydrofuran (THF), sowie Suspensionen in Frage. [0018] Erfindungsgemäß verwendbare Mikrodosierelemente sind bekannt. Hierzu wird auf die beiden Patentschriften DE 198 02 367 C1 und DE 198 02 368 C1 der Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e. V., Stuttgart, DE verwiesen. Diese Mikrodosierelemente umfassen eine mit Fluid befüllbare Dosierkammer mit auslenkbarer Membran, eine Betätigungseinrichtung zum Auslenken der Membran und eine Austrittsdüse. Die Dosierkammer wird vor Beginn des Ausstoßens des Fluids mit Fluid befüllt und dann durch die Betätigungseinrichtung, zumeist stapelförmige Piezokeramiken, betätigt, wodurch die Membran in das Innere der Dosierkammer ausgelenkt und das Fluid durch die Austrittsdüse ausgestoßen wird. Nach Ende des Ausstoßvorgangs wird die Dosierkammer beim Rückkehren der Membran in ihre Ausgangslage wieder mit Fluid befüllt und ist für den nächsten Ausstoßvorgang bereit.

[0019] Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist es bevorzugt, wenn der Objektträger in der horizontalen (x, y)-Ebene und gegebenenfalls auch in der vertikalen z-Richtung bewegbar ist. Der oder die Dispensierköpfe können in diesem Fall bewegbar oder nichtbewegbar sein. Falls ein oder mehrere Dispensierköpfe nichtbewegbar sind, erfolgt eine Relativbewegung zwischen Dispensierkopf und Objektträger ausschließlich durch eine Bewegung des Objektträgers, die dann vorzugsweise in der (x, y)-Ebene und gegebenenfalls auch in z-Richtung erfolgt. Auf eine Bewegung des Objektträgers in der z-Richtung kann insbesondere verzichtet werden, wenn Objekte verwendet werden, die jeweils gleiche Abmessung in z-Richtung aufweisen, so dass ein jeweiliges Einstellen des relativen Abstandes zwischen Objektträger und Dispensierkopf in der z-Richtung nicht notwendig ist.

[0020] Falls ein Dispensierkopf bewegbar ist, ist es bevorzugt, wenn der Dispensierkopf in der horizontalen (x, y)-Ebene und gegebenenfalls zusätzlich entlang der vertikalen z-Richtung oder nur entlang der vertikalen z-Richtung bewegbar ist. Auf eine Bewegung eines Dispensierkopfes in der z-Richtung kann insbesondere verzichtet werden, wenn Objekte verwendet werden, die jeweils gleiche Abmessung in z-Richtung aufweisen, so dass ein jeweiliges Einstellen des relativen Abstandes zwischen Objektträger und Dispensierkopf in der z-Richtung nicht notwendig ist.

[0021] Wenn nur ein bewegbarer Dispensierkopf vorliegt ist es von Vorteil, wenn der Dispensierkopf ausschließlich entlang der vertikalen z-Richtung bewegbar ist. In diesem Fall vollführt der Objektträger eine ausschließliche Bewegung in der (x, y)-Ebene, so dass eine Annäherung oder Entfernung zwischen Objektträger und Dispensierkopf durch eine Bewegung des Dispensierkopfes in der vertikalen z-Richtung erfolgt.

[0022] Gleichmaßen ist es von Vorteil, dass bei einer Bewegung des Objektträgers in der vertikalen z-Richtung, ein Dispensierkopf nur in der (x, y)-Ebene bewegt wird, so dass eine Annäherung oder Entfernung zwischen Objektträger und Dispensierkopf ausschließlich durch eine Bewegung des Objektträgers in der vertikalen z-Richtung erfolgt.

[0023] Eine Bewegung eines Dispensierkopfes in der (x, y)-Ebene umfasst auch eine eindimensionale Bewegung des Dispensierkopfes in x-Richtung oder y-Richtung.

[0024] Bei einer speziellen Ausführungsform der Erfindung ist wenigstens ein Dispensierkopf an wenigstens einem Dispensierkopfträger befestigt. Dies impliziert, dass an einem Dispensierkopfträger ein oder mehrere Dispensierköpfe befestigt sein können. Gleichmaßen können ein oder mehrere Dispensierkopfträger angeordnet werden. Ein Dispensierkopfträger ist dabei zur x- oder y-Richtung der horizontalen (x, y)-Ebene parallel bewegbar angeordnet. Je-

der Dispensierkopf ist an dem Dispensierkopfträger bewegbar befestigt und kann längs des Dispensierkopfträgers, d. h. entweder in der x-Richtung oder y-Richtung, je nach Anordnung des Dispensierkopfträgers, bewegt werden. Eine Bewegung in der horizontalen (x, y)-Ebene eines Dispensierkopfes entsteht somit durch eine Überlagerung einer eindimensionalen Bewegung des Dispensierkopfes entlang des Dispensierkopfträgers und einer eindimensionalen Bewegung des Dispensierkopfträgers in der hierzu senkrechten Richtung.

[0025] Eine besonders vorteilhafte und bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sieht vor, dass der Dispensierkopf bzw. die Dispensierköpfe ausschließlich zum Einnehmen einer Arbeitsstellung, bei welcher ein Dispensieren erfolgen soll, oder zum Einnehmen einer Ruhestellung, bei welcher ein Dispensieren nicht vorgesehen ist, bewegt werden. Dies beinhaltet auch den Fall, dass ein Dispensierkopf von einer Arbeitsstellung in eine andere Arbeitsstellung bewegt wird. Ist eine Arbeitsstellung eines Dispensierkopfes erst einmal eingenommen worden, d. h. durch eine Bewegung des Dispensierkopfes in der horizontalen (x, y)-Ebene und in der hierzu senkrechten, vertikalen z-Richtung, bzw. eine Bewegung nur in der horizontalen (x, y)-Ebene, bzw. eine Bewegung nur in der vertikalen z-Richtung, bleibt der Dispensierkopf während des Dispensiervorganges statisch und es erfolgt eine ausschließliche Bewegung des Objektträgers in der horizontalen (x, y)-Ebene. Die Bewegung des Dispensierkopfes in der vertikalen z-Richtung kann durch eine Bewegung des Objektträgers in der vertikalen z-Richtung ergänzt oder ersetzt werden. Im letzten Fall wird der Dispensierkopf nur in der (x, y)-Ebene bewegt.

[0026] Ist der Dispensiervorgang abgeschlossen, kann ein Dispensierkopf durch eine erneute Bewegung in der horizontalen (x, y)-Ebene und in der hierzu senkrechten, vertikalen z-Richtung bzw. nur in der (x, y)-horizontalen Ebene bzw. nur in der vertikalen z-Richtung, in eine Arbeitsstellung gebracht werden, in der er für den sich anschließenden Dispensiervorgang statisch bleibt und eine ausschließliche Bewegung des Objektträgers in der horizontalen (x, y)-Ebene erfolgt. Die Bewegung des Dispensierkopfes in der vertikalen z-Richtung kann wieder durch eine Bewegung des Objektträgers in der vertikalen z-Richtung ergänzt oder ersetzt werden. Im letzten Fall wird der Dispensierkopf nur in der (x, y)-Ebene bewegt.

[0027] Ein Dispensierkopf kann durch eine Bewegung in der horizontalen (x, y)-Ebene und in der hierzu senkrechten, vertikalen z-Richtung bzw. nur in der horizontalen (x, y)-Ebene bzw. nur in der vertikalen z-Richtung aus einer Arbeitsstellung in eine Ruhestellung gebracht werden, wobei die Bewegung des Dispensierkopfes in der vertikalen z-Richtung durch eine Bewegung des Objektträgers in der vertikalen z-Richtung ergänzt oder ersetzt werden kann. Im letzten Fall wird der Dispensierkopf nur in der (x, y)-Ebene bewegt.

[0028] Im Falle des Vorliegens eines nichtbewegbaren Dispensierkopfes werden Arbeitsstellung und Ruhestellung vom Objektträger eingenommen. In einer Arbeitsstellung des Objektträgers kann ein Dispensieren der Fluide erfolgen, wohingegen in einer Ruhestellung des Objektträgers ein solches Dispensieren der Fluide nicht vorgesehen ist. In einer Ruhestellung des Objektträgers wird der Objektträger vorzugsweise von dem Dispensierkopf entfernt, so dass ein freier Zugriff zum Dispensierkopf und insbesondere der Patronen möglich ist.

[0029] Die Geschwindigkeiten und Beschleunigungen eines Dispensierkopfes sind bei diesen Bewegungen wesentlich kleiner, als die dem Objektträger beim automatischen Dispensieren auferlegten Geschwindigkeiten und Beschleu-

nigungen.

[0030] Im Gegensatz zu den bei herkömmlichen Systemen verwendeten vergleichsweise langsamen Relativbewegungen und -beschleunigungen zwischen Objektträger und Dispensierkopf ist der Objektträger hier vorzugsweise mit einer Geschwindigkeit von wenigstens 800 mm/s und einer Beschleunigung von wenigstens 10 m/s² bewegbar. Dies kann beispielsweise erfolgen, indem der Objektträger über Spulenlinearantriebe oder über einen zweidimensionalen Schrittmotor, jeweils mit einer genauen Ortsauflösung, angetrieben ist. Erfindungsgemäß ist eine bidirektionale Ortsauflösung auf dem Objekt von weniger als 50 µm bevorzugt.

[0031] Ein besonders vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sieht vor, dass die Patronen manuell und/oder automatisch; einzeln und/oder blockweise an einem Dispensierkopf über ihr Befestigungselement befestigbar sind. Die Patronen können beispielsweise durch eine Klemmverbindung am Dispensierkopf befestigt sein. Dies ermöglicht, dass der Dispensierkopf ohne aufwändige Bestück- und/oder Wartungsarbeiten mit Patronen schnell bestückt werden kann. Ebenso ist ein Auswechseln von Patronen leicht möglich, falls beispielsweise die Fluide dieser Patronen nicht mehr benötigt werden oder die Patronen leer sind. Ein automatisches Bestücken der Dispensierköpfe mit den Patronen kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass die Patronen über einen Roboterarm am jeweiligen Dispensierkopf befestigt werden. Gleichermassen ist es möglich, dass ein Roboterarm oder eine Bedienperson die Patronen auf den Objektträger setzen und der entsprechende Dispensierkopf über die Patronen gebracht und anschließend auf die Patronen so abgesenkt wird, dass die Patronen am Dispensierkopf befestigt werden.

[0032] Weiterhin ist es bevorzugt, dass ein Dispensierkopf über eine automatische Patronenauswurfvorrichtung verfügt, so dass die am Dispensierkopf befestigten Patronen einzeln und/oder blockweise automatisch ausgeworfen werden können. Alternativ ist es möglich, dass die Patronen beispielsweise von einem Roboterarm oder einer Bedienperson abgenommen werden. Ein Bestücken, Abnehmen oder Auswechseln der Patronen erfolgt dabei vorzugsweise in einer Ruhestellung des Dispensierkopfes, d. h. in einer Stellung, in der kein Dispensieren vorgesehen ist, welche vorteilhaft abseits des Objektes befindlich ist. Bei mehreren Dispensierköpfen können ein Bestücken, Abnehmen oder Auswechseln der Patronen bzw. jegliche Wartungsarbeiten an einem Dispensierkopf stets dann erfolgen, wenn wenigstens ein anderer Dispensierkopf in Arbeitsstellung zum Dispensieren bereit ist, so dass beispielsweise bei einem Ersatz/Austausch von Fluiden praktisch kein Zeitverlust entsteht. Falls ein Dispensierkopf nichtbewegbar ist, erfolgt ein Bestücken, Abnehmen oder Auswechseln der Patronen am Dispensierkopf, vorzugsweise in einer Ruhestellung des Objektträgers.

[0033] Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist es besonders vorteilhaft, wenn die Patronen und die Mikrodosierelemente, d. h. alle mit Fluid in Berührung kommenden Elemente, chemisch beständig gegen aggressive Substanzen sind. Beispielsweise können die Patronen aus Kunststoffen, wie z. B. Polypropylen (PP), Peek, Teflon und dergleichen gefertigt sein. Die Mikrodosierelemente können z. B. aus Silizium, Kunststoffen, wie z. B. PP, Peek, Teflon und dergleichen, und Pyrex hergestellt sein.

[0034] Ferner können die Patronen auch zur langdauernden Lagerung der Fluide verwendet werden. So ist es möglich fluidbefüllte Patronen aus einem externen Lager in die erfindungsgemäße Vorrichtung einzusetzen, ohne dass dabei ein Umfüllen des Fluids von einem Vorratsgefäß in die Patronen mit der Gefahr einer möglichen Verunreinigung des

kopf 7 ist mit einer Klemmmechanik 6 zum Anklemmen der Patronen 3, sowie mit einer automatischen Patronenauswurfvorrichtung 6 zum automatischen Auswerfen der Patronen versehen. Des weiteren befindet sich dort ein Elektronikelement, mit dem der automatische Auswurf der Patronen 3 gesteuert wird. In 12 befindet sich die Schnittstellenelektronik für die einzelnen Patronen 3.

[0054] In Fig. 3 ist der schematische Aufbau einer erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung mit einem Dispensierkopf 8 auf einem Dispensierkopfräger 11 veranschaulicht. Wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, ist der Dispensierkopf 8 an einem U-förmigen Dispensierkopfräger 11 befestigt. Der Dispensierkopfräger 11 ist längs der x-Richtung der horizontalen (x, y)-Ebene angeordnet. Der Dispensierkopf 8 kann bei dieser Ausführung nur in der vertikalen z-Richtung bewegt werden. Eine Arbeits- bzw. Ruhestellung des Dispensierkopfes 8 wird somit durch ausschließliche Bewegung des Dispensierkopfes 8 entlang der z-Richtung eingenommen. Arbeits- und Ruhestellung des Dispensierkopfes 8 können identisch sein. Der Dispensierkopfräger 11 ist nicht bewegbar. Das Objekt 10, auf das dispensiert werden soll, befindet sich auf dem Objektträger 9. Der Objektträger 9 ist in der horizontalen (x, y)-Ebene bewegbar.

[0055] Bei einem Dispensiervorgang nimmt der Dispensierkopf 8 seine Arbeitsstellung entlang der z-Richtung ein, d. h. dieser senkt oder hebt sich bis zu einer für den Dispensiervorgang geeigneten Entfernung vom Objekt 10. In seiner Arbeitsstellung bleibt der Dispensierkopf 8 für den Dispensiervorgang statisch, d. h. es erfolgt keine weitere Bewegung des Dispensierkopfes 8 entlang der z-Richtung. Das für den Dispensiervorgang notwendige Einstellen der relativen Positionen in der (x, y)-Ebene zwischen Patronen 3 und Objekt 10 erfolgt ausschließlich durch eine Bewegung des Objektträgers in der (x, y)-Ebene. Nach Beendigung des Dispensiervorgangs kann der Dispensierkopf 8 durch Bewegung entlang der z-Richtung in eine Ruhestellung gebracht werden. Insbesondere kann der Objektträger 8 hierzu auf den Objektträger abgesenkt werden.

[0056] In Fig. 4 ist der schematische Aufbau einer erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung mit drei Dispensierköpfen 8 auf zwei Dispensierkopfrägern 11 veranschaulicht. Der grundsätzliche Aufbau der Dispensierköpfe 8 und der Dispensierkopfräger 11 stimmt mit dem der Fig. 3 überein. Die Dispensierkopfräger 11 sind parallel zur x-Richtung der (x, y)-Ebene angeordnet und in y-Richtung bewegbar. Die Dispensierköpfe 3 sind längs der Dispensierkopfräger 11 parallel zur x-Richtung bewegbar. Eine Bewegung der Dispensierköpfe 8 in der (x, y)-Ebene erfolgt deshalb durch eine Überlagerung der jeweils eindimensionalen Bewegung der Dispensierköpfe 8 in x-Richtung und der Dispensierkopfräger 11 in y-Richtung. Zudem sind die Dispensierköpfe 8 in z-Richtung bewegbar. Der Objektträger 9 ist in der (x, y)-Ebene bewegbar.

[0057] Eine Bewegung der Dispensierköpfe 8 bzw. Dispensierkopfräger 11 erfolgt ausschließlich zu dem Zweck die Dispensierköpfe 8 von einer Ruhestellung in eine Arbeitsstellung, von einer Arbeitsstellung in eine andere Arbeitsstellung, bzw. von einer Arbeitsstellung in eine Ruhestellung zu bringen. Ist ein Dispensierkopf 8 erst einmal in eine Arbeitsstellung gebracht worden, so bleibt er beim automatischen Dispensieren statisch. Das zum Dispensieren notwendige Einstellen der relativen Positionen zwischen Patronen 3 und Objekt 10 erfolgt ausschließlich durch eine Bewegung des Objektträgers 9 in der (x, y)-Ebene. Die Geschwindigkeiten und Beschleunigungen der Dispensierköpfe 8 und Dispensierkopfräger 11 sind deshalb weitaus geringer, als diejenigen des Objektträgers 10.

1. Vorrichtung zum automatischen Dispensieren mikroskopischer Volumina von Fluiden, welche wenigstens einen bewegbaren oder nichtbewegbaren Dispensierkopf (8) mit einer Mehrzahl daran befestigter Patronen (3), einen bewegbaren Objektträger (9) mit wenigstens einem darauf befindlichen Objekt (10) zur Aufnahme der dispensierten Fluidvolumina, sowie eine Steuereinrichtung zur Steuerung des Dispensiervorganges umfasst, wobei die Patronen (3) jeweils einen mit Fluid gefüllten Tank (2), ein mit dem Tank (2) fluidmäßig verbundenes Mikrodosierelement (4), sowie ein Befestigungselement (1) zur Befestigung am Dispensierkopf (8) aufweisen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Objektträger (9) in der horizontalen Ebene (x, y) und gegebenenfalls entlang der vertikalen Richtung (z) bewegbar ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Dispensierkopf (8) in der horizontalen Ebene (x, y) und gegebenenfalls entlang der vertikalen Richtung (z) oder nur entlang der vertikalen Richtung (z) bewegbar ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass entweder ein Dispensierkopf (8) oder der Objektträger in der vertikalen Richtung (z) bewegt werden.
5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Dispensierkopf (8) an wenigstens einem zur x- oder y-Richtung der horizontalen Ebene (x, y) parallel angeordneten Dispensierkopfräger (11) längs des Dispensierkopfrägers (11) und gegebenenfalls in der z-Richtung bewegbar befestigt ist, wobei der Dispensierkopfräger (11) senkrecht zur Richtung seiner Anordnung in x- oder y-Richtung bewegbar ist und eine Bewegung eines Dispensierkopfes (8) in der horizontalen Ebene durch eine Überlagerung einer Bewegung des Dispensierkopfes (8) längs des Dispensierkopfrägers (11) und einer Bewegung des Dispensierkopfrägers (11) in der hierzu senkrechten Richtung erfolgt.
6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Dispensierkopf (8) nur zum Einnehmen einer Arbeitsstellung oder einer Ruhestellung des Dispensierkopfes (8) bewegt wird, wobei in einer Arbeitsstellung des Dispensierkopfes (8) nur eine Bewegung des Objektträgers (9) erfolgt.
7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Objektträger (9) mit einer Geschwindigkeit von wenigstens 800 mm/s und einer Beschleunigung von wenigstens 10 m/s² bewegbar ist.
8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Objektträger (9) in der (x, y)-Ebene über einen Spulenlinearantrieb angetrieben ist.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Objektträger (9) in der (x, y)-Ebene über einen zweidimensionalen Schrittmotor angetrieben ist.
10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jeder Ort auf dem Objekt (10) von jeder Patrone (3) mit einer Ortsauflösung von wenigstens 50 µm ansteuerbar ist.
11. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3)

Fluids und/oder Kontamination der Umgebung/Bedienpersonal notwendig wäre. Somit können die fluidbefüllten Patronen auch dauerhaft in der erfindungsgemäßen Vorrichtung belassen werden.

[0035] Erfindungsgemäß ist es weiterhin bevorzugt, dass die Patronen mit Fluid wiederbefüllbar sind. In vorteilhafter Weise können durch die mehrfache Verwendung von Patronen Kosten eingespart werden.

[0036] In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung weisen die Patronen jeweils ein Volumen von 1–5 mL, vorteilhaft 2 mL auf.

[0037] Die am Dispensierkopf der erfindungsgemäßen Vorrichtung befestigten Patronen können gleiche oder unterschiedliche Fluide beinhalten. Insbesondere können alle Patronen mit unterschiedlichen Fluiden befüllt werden, so dass ein Ensemble aller üblich verwendeten Substanzen ständig bereit gehalten wird. Es ist also im Unterschied zu herkömmlichen automatischen Dispensiervorrichtungen nicht notwendig, dass eine Dispensiereinheit bzw. Patrone für unterschiedliche Fluide verwendet werden muss. Jedes Fluid verfügt über seine "eigene" Patrone. Ebenso kann auf das Spülen der Patrone verzichtet werden, so dass praktisch kein Totvolumen an nicht-dispensiertem Fluid verloren geht. Ferner können teure Substanzen in mehrfachen Versuchsreihen eingesetzt werden.

[0038] Weiterhin ist es vorteilhaft, wenn die Patronen jeweils mit einem elektrisch auslesbaren Code versehen sind. Ein solcher Code kann beispielsweise über ein EEPROM, HF-tag, Barcode und dergleichen gespeichert werden. Der Code kann fluid- bzw. patronenspezifische Daten, wie beispielsweise Substanzidentifizierung, Lösungsmittelidentifizierung, Fülldatum, Alterung, Reinheit und dergleichen enthalten. Diese Daten können direkt der Versuchsplanung zugeführt werden, so dass stets ein optimaler Einsatz bzw. Verfügbarkeit von Substanzen gewährleistet ist. Bei einem Patronenwechsel muss somit aufgrund der patronenspezifischen Daten die zu bestückende Position nicht vom Bediener mitgeteilt werden, weil das System dies automatisch erkennen kann.

[0039] In bevorzugter Weise werden die Patronen am Dispensierkopf matrizenförmig angeordnet. Als vorteilhaft hat sich insbesondere eine 10 × 10-Matrix mit insgesamt 100 Patronen bzw. eine 8 × 12-Matrix mit insgesamt 96 Patronen erwiesen. Wird die matrizenförmige Anordnung so ausgelegt, dass jede Patrone ein Grundelement eines Rasters mit der Größe 9 × 18 mm abdeckt, kann in vorteilhafter Weise Kompatibilität zu 96-, 384-, 1536-Well-Mikrotiterplatten, zumindest in einer Dimension, hergestellt werden. Deckt eine Patrone ein Grundelement eines Rasters mit der Größe 9 × 9 mm ab, kann in vorteilhafter Weise Deckungsgleichheit zu 96-Well-Mikrotiterplatten erreicht werden.

[0040] Vorzugsweise wird die Steuereinheit so ausgelegt, dass jede Patrone unabhängig von den anderen Patronen separat ansteuerbar ist. Gleichwohl können auch mehrere oder alle Patronen gemeinsam angesteuert werden. So können jede einzelne Patronen und jeder frei wählbare Ort eines Objektes übereinander gebracht und dort eine wählbare Menge an Fluid ausgestoßen werden. Dies ermöglicht in vorteilhafter Weise das Dispensieren auf ein formatfreies Objekt. Insbesondere ist es nicht notwendig als Zielobjekte Mikrotiterplatten zu verwenden. Vielmehr kann auf jedes beliebige Objekt, beispielsweise Syntheseplättchen, mit einer hohen Ortsauflösung dispensiert werden.

[0041] In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind die Patronen jeweils zum Dispensieren von Volumina im Bereich von 1–1000 nL, vorzugsweise 10–1000 nL und insbesondere bevorzugt 50–500 nL geeignet, so dass im Unterschied zu

herkömmlichen Vorrichtungen wesentlich größere Volumina pro Einzelschuss dispensiert und die Verdampfungsverluste an Fluid hierdurch minimiert werden können.

[0042] Ferner sind die Patronen jeweils zum Dispensieren mit einer Volumen-Rate von > 100 nL/s, bevorzugt > 500 nL/s geeignet. Außerdem ist mit den Patronen vorzugsweise mit einem Fehler von weniger als 5 Vol.-% über alle Fluide zu dispensieren, wobei beim Dispensieren eine Kegel-Streuung von höchstens ±5° auftritt.

[0043] Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann eine Heiz-/Kühlvorrichtung und zudem eine thermisch isolierende Abdeckung und/oder eine oder mehrere Zwischenwände aufweisen. Damit ist es möglich, dass die Patronen und/oder das Zielobjekt wahlweise gekühlt oder geheizt werden. So kann beispielsweise die Temperatur zur Lagerung der Fluide geeignet gewählt werden oder die Konsistenz bestimmter Fluide kann in geeigneter Weise für den Dispensiervorgang eingestellt werden. Ferner kann die Temperatur eines oder mehrerer Objekte so eingestellt werden, dass der Ablauf bestimmter Reaktionen begünstigt wird. Insbesondere können unterschiedliche Objekte auf verschiedenen Temperaturen gehalten werden.

[0044] Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird vorteilhaft zum Dispensieren von Fluiden in chemischer Synthese in Flüssig- und Festphasensystemen, insbesondere im Bereich der kombinatorischen Chemie eingesetzt, wo es entscheidend darauf ankommt kleine Volumina oftmals teurer Substanzen dispensieren zu können. Zudem muß ein wahlfreier schneller Zugriff auf ein bestimmtes Ensemble einzusetzender Substanzen möglich sein. In besonders vorteilhafter Weise werden hierzu Dispensierköpfe eingesetzt, die mit wenigstens 200 Patronen bestückt sind.

[0045] Ferner kann die erfindungsgemäße Vorrichtung zum biologischen und diagnostischen Screening eingesetzt werden. In besonders vorteilhafter Weise werden hierzu Dispensierköpfe eingesetzt, die mit wenigstens 10 Patronen bestückt sind.

[0046] Im weiteren wird eine spezielle Ausführungsform der vorliegenden Erfindung unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen veranschaulicht.

[0047] Fig. 1 zeigt in perspektivischer Darstellung eine Patrone der erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung;

[0048] Fig. 2 zeigt in perspektivischer Darstellung einen Dispensierkopf der erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung;

[0049] Fig. 3 zeigt in perspektivischer Darstellung den schematischen Aufbau einer erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung mit einem Dispensierkopf auf einem Dispensierkopfträger; und

[0050] Fig. 4 zeigt in perspektivischer Darstellung den schematischen Aufbau einer erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung mit drei Dispensierköpfen auf zwei Dispensierkopfträgern.

[0051] Wie aus Fig. 1 ersichtlich ist, umfasst eine Patrone 3 der erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung einen Tank 2, ein Mikrodosierelement 4 und eine Klemmverbindung 1.

[0052] Die Patrone 3 kann über die Klemmverbindung 1 an der Klemm-Mechanik 6 des Montagekopfes 7 befestigt werden, und insbesondere ohne aufwändige Bestückungs-/Wartungsarbeiten schnell bestückt, abgenommen bzw. ausgetauscht werden. Durch die kompakte Bauweise der Patrone 3 mit einer integrierten Anordnung des Mikrodosierelementes 4 wird das mechanisch zumeist sehr empfindliche Mikrodosierelement 4 vor Patronengehäuse geschützt.

[0053] Fig. 2 zeigt einen Dispensierkopf 8 der erfindungsgemäßen Dispensiervorrichtung. Der Dispensierkopf 8 umfasst einen Montagekopf 7 mit einer daran befestigten matrizenförmigen Anordnung 5 der Patronen 3. Der Montage-

an einem Dispensierkopf (8) manuell und/oder automatisch, einzeln und/oder blockweise befestigbar sind.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11 dadurch gekennzeichnet, dass das Befestigungselement (1) der Patronen (3) eine Klemmverbindung (1) ist.

13. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Dispensierkopf (8) mit einer Patronenauswurfvorrichtung (6) zum automatischen Auswerfen von Patronen (3) ausgerüstet ist.

14. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) und die Mikrodosierelemente (4) chemisch beständig sind.

15. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) wiederbefüllbar sind.

16. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) zur Lagerung der Fluide geeignet sind.

17. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) jeweils ein Volumen von 1–5 mL, insbesondere 2 mL aufweisen.

18. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) jeweils gleiche oder unterschiedliche Fluide beinhalten.

19. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) jeweils mit einem elektrisch auslesbaren Code versehen sind.

20. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Dispensierköpfe (8) jeweils eine matrizenförmige Anordnung (5) der Patronen (3), insbesondere in Form einer 10 × 10-Matrix oder 8 × 12-Matrix, aufweisen.

21. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Steuereinheit geeignet ist, die Patronen (3) jedes Dispensierkopfes (8) separat anzusteuern.

22. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mit jeder Patrone (3) auf wahlfreie Orte eines Objektes (10) dispensiert werden kann.

23. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) jeweils zum Dispensieren von Volumina im Bereich von 1–1000 nL, vorzugsweise 10–1000 nL und insbesondere bevorzugt 50–500 nL geeignet sind.

24. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) jeweils zum Dispensieren mit einer Volumenrate von größer als 100 nL/s geeignet sind.

25. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) jeweils zum Dispensieren mit einem Fehler von weniger als 5 Vol.-% geeignet sind.

26. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Patronen (3) beim Dispensieren jeweils eine Kegel-Streuung von höchstens $\pm 5^\circ$ in der Dispensier(Strahl)achse aufweisen.

27. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Heiz-/Kühlvorrichtung aufweist.

28. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine tempe-

raturisolierende Abdeckung und/oder eine oder mehrere Zwischenwände aufweist.

29. Vorrichtung nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass Patronen (3) und/oder Objekt(e) (10) separat heiz-/kühlbar sind.

30. Verwendung der Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum Dispensieren in Flüssig- und Festphasensystemen, insbesondere im Bereich der Kombinatorischen Chemie.

31. Verwendung der Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum biologischen und diagnostischen Screening.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

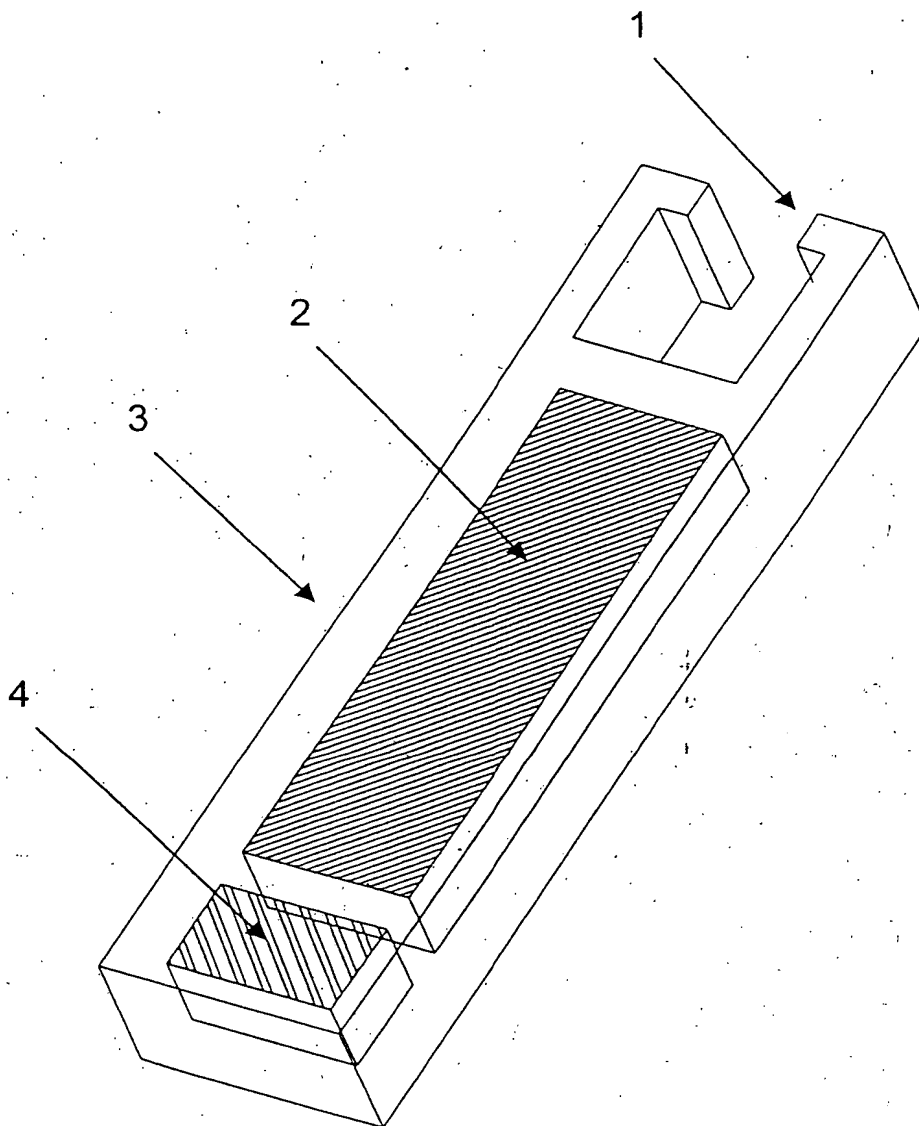


Fig. 1

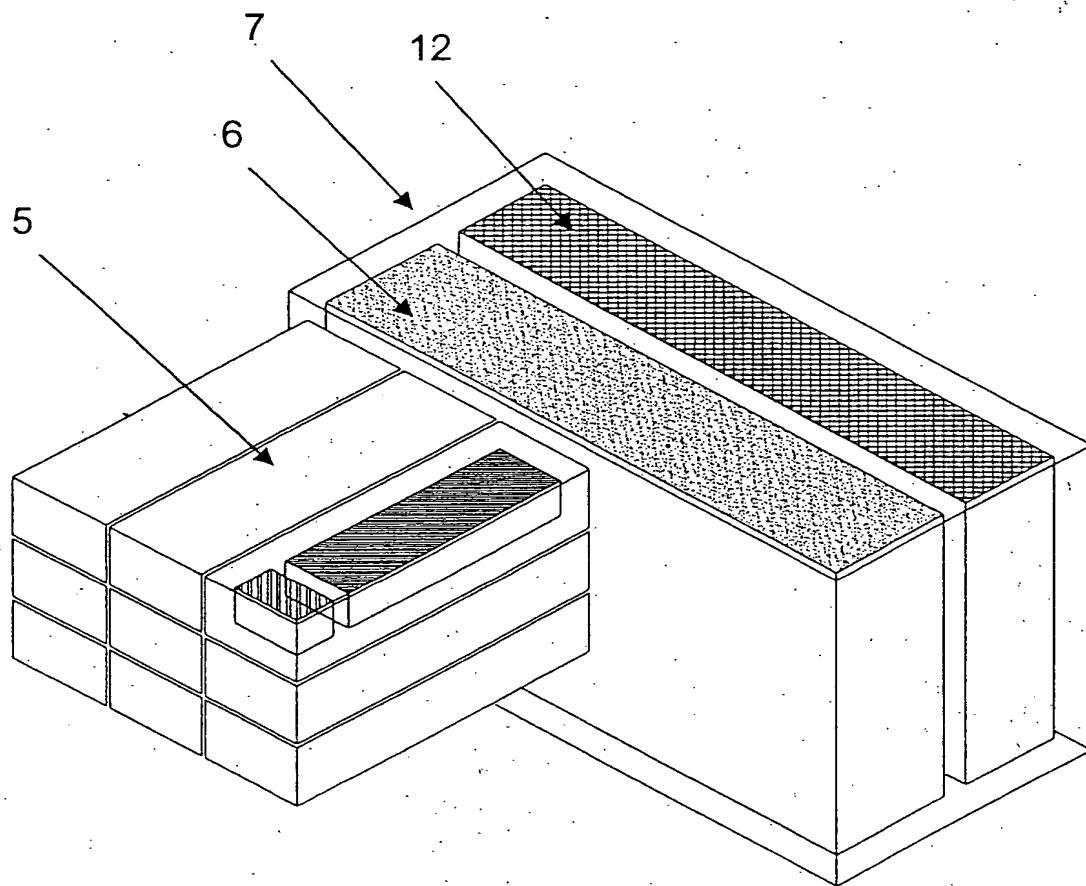


Fig. 2

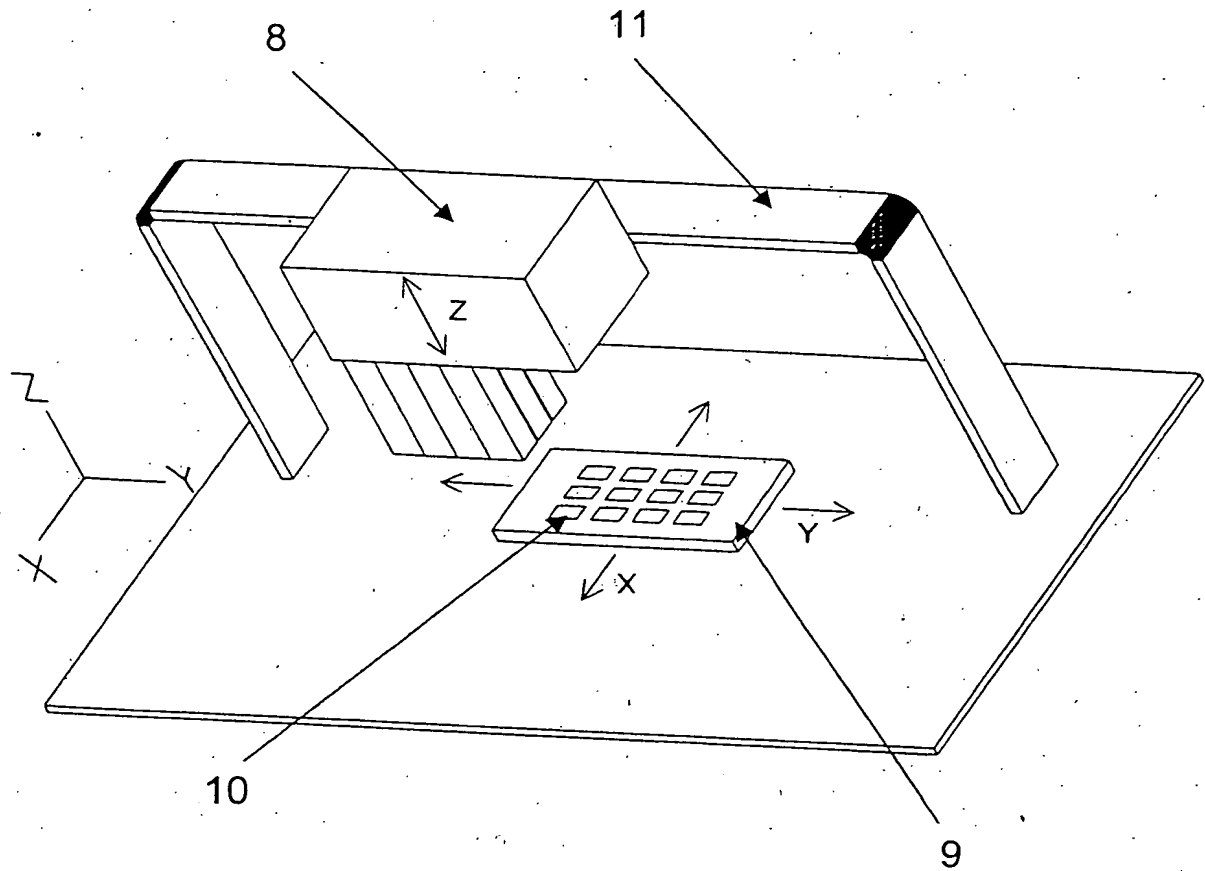


Fig. 3

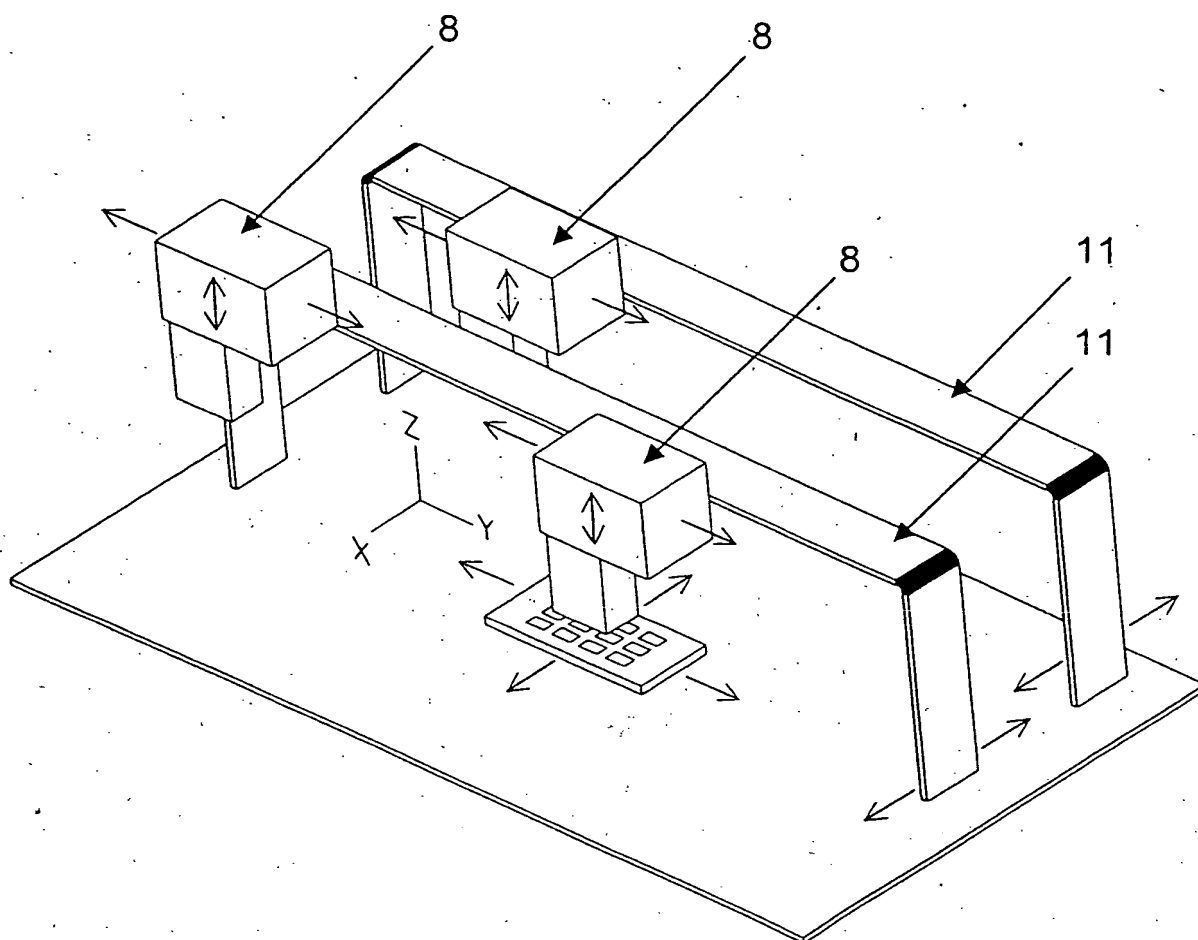


Fig. 4